

(12) EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 86108907.6

(51) Int. Cl.⁴: G 01 N 33/53
//G01N33/543, C12Q1/68

(22) Anmeldetag: 01.07.86

(30) Priorität: 09.07.85 DE 3524451

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
25.02.87 Patentblatt 87/9

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

(71) Anmelder: BEHRINGWERKE Aktiengesellschaft
Postfach 1140
D-3550 Marburg 1(DE)

(72) Erfinder: Franze, Reinhard, Dr.
Michaelsgasse 2
D-3551 Lahntal-Sterzhausen(DE)

(72) Erfinder: Beschle, Hans Georg, Dr.
Albert-Demnitz-Weg 6
D-3550 Marburg(DE)

(74) Vertreter: Becker, Heinrich Karl Engelbert, Dr. et al,
HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT Central Patent
Department P.O. Box 80 03 20
D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

(54) Mit Überzügen versehene Formkörper zur Bindung von bioaffinen Substanzen. Verfahren zu ihrer Herstellung sowie ihre Verwendung.

(57) Es werden Formkörper mit Überzügen aus Polymeren beschrieben, die an ihrer Oberfläche biologische Substanzen mit bioaffinen Bindungseigenschaften binden sowie Formkörper, an die solche biologischen Substanzen gebunden sind. Weiterhin werden Verfahren zur Herstellung solcher Formkörper beschrieben.

Formkörper versehen mit Überzügen und daran gebundenen biologischen Materialien können beispielsweise als diagnostisches Mittel in Enzymimmunoassays oder Assays, die von einer Nukleinsäurehybridisierung Gebrauch machen, verwendet werden.

EP 0 211 229 A2

BEST AVAILABLE COPY

Mit Überzügen versehene Formkörper zur Bindung von bioaffinen Substanzen, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie ihre Verwendung

Die Erfindung betrifft Formkörper mit Überzügen aus Polymeren, wobei der Überzug die Eigenschaft hat, biologische Substanzen mit bioaffinen Bindungseigenschaften zu binden, sowie ein Verfahren zu ihrer Herstellung. Diese mit Überzügen versehenen Formkörper können als "Träger" zur Bindung eines Partners eines bioaffinen Bindungspaares verwendet werden.

Für biologische Testverfahren werden oft Komponenten an einen festen Träger gebunden, um beispielsweise überschüssige Reaktionspartner leichter entfernen zu können. Trägergebundene Reaktionspartner werden beispielsweise in Radio- und Enzymimmunoassays verwendet. Zur Verbesserung der Haftung von biologischem Material an Kunststoffoberflächen sind solche Oberflächen bestrahlt worden. Weiterhin ist die Bindung von Testkomponenten an Träger durch Behandeln mit bifunktionellen chemischen Reagenzien wie Glutardialdehyd verbessert worden.

Es ist auch vorgeschlagen worden, zur Verringerung der Schwankungsbreite immunologischer Testverfahren Kunststoffträger zur Beschichtung mit immunologisch aktivem Material zu verwenden, die weniger als 1 Gewichtsprozent Hilfs- und Zusatzstoffe enthalten (EP-A 0 126 392).

Für Verfahren, an denen eine Nukleinsäurehybridisierung beteiligt ist, sind zur Bindung einzelsträngiger Nukleinsäuren Membranen verwendet worden. Solche Membranen sind üblicherweise aus Nitrozellulose. Es ist auch bekannt,
5 die Bindung von Nukleinsäuren an Kunststoffoberflächen durch Behandeln der Oberflächen mit Protamin zu fördern.

Jede dieser Methoden löst jeweils nur bestimmte Probleme in biologischen Bestimmungsverfahren, die mit trägergebundenen Komponenten arbeiten.
10

Es besteht deshalb weiterhin die Aufgabe, Verfahren zu finden, mit deren Hilfe die Haftung biologischen Materials an Trägeroberflächen verbessert werden kann.
15

Überraschenderweise wurde gefunden, daß durch Behandeln von Oberflächen von Formkörpern beispielsweise von Mikrottestplatten mit einer Lösung von Zellulosenitrat die Bindungseigenschaften dieser Formkörper für Nukleinsäuren oder Proteine oder sogar für Mikroorganismen wie Viren verbessert werden. Durch diese Behandlung war es überhaupt erst möglich geworden, Nukleinsäuren an Polystyrol zu binden, wie es für die Herstellung von Mikrottestplatten häufig verwendet wird.
20

Gegenstand der Erfindung ist daher ein Formkörper mit einem Überzug aus einem Polymer, wobei die Kombination für wässrige Lösungen undurchlässig ist, dadurch gekennzeichnet, daß der Überzug aus einem Polymer besteht oder
25 ein solches enthält, das die Eigenschaft besitzt, aus wässrigen Lösungen eine biologische Substanz, die ein bioaffiner Bindungspartner ist, zu binden.
30

Die Formkörper können aus Glas, Keramik oder aus Kunststoffen bestehen. Sie können beispielsweise plane Plättchen, Platten mit konkaven Vertiefungen zur Aufnahme von Lösungen wie Mikrottestplatten oder Röhrchen, Kugeln oder auch Küvetten sein.
35

Ein geeigneter Überzug besteht aus einem Polymeren, welches einmal die Eigenschaften hat, an dem Material des Formkörpers zu haften, zum anderen biologische Materialien aus wässrigen Lösungen zu binden in einer Weise, daß
5 sie als Reaktionspartner von bioaffinen Bindungssystemen verfügbar bleiben. Der Verbund aus einem Formkörper und einem Überzug ist für wässrige Lösungen undurchlässig.

Der Überzug kann aus einem Polymer oder aus einer Mischung
10 von mehreren Polymeren bestehen. Er kann Zusätze enthalten, welche einerseits die Anhaftung des Überzugs an den Formkörper und andererseits die Bindung der bioaffinen Komponenten begünstigen.

15 Als Polymere sind beispielsweise derivatisierte Zellulosen, wie Zellulosenitrate, davon insbesondere Kollodiumwollen, sowie Acetylzellulose, synthetische Polymere wie Polyamide, vorzugsweise in Alkoholen lösliche Mischpolyamide, Polyacrylsäure, davon die partiell veresterten oder
20 auch amidierten Derivate, sowie partiell veresterte oder partiell acetalisierte Polyvinylalkohole geeignet. Es werden Polymere bevorzugt, die die optischen Eigenschaften des Formkörpers, beispielsweise die Transparenz oder die Reflektion nicht oder nur wenig verändern.

25 Die Polymeren werden entweder in Lösung oder in Dispersion oder auch als Pulver beispielsweise in Sprüh- oder in Tauchverfahren auf den Formkörper aufbracht. Bei Verwendung von Röhrchen oder von Mikrottestplatten als Formkörper
30 wird die polymerhaltige Lösung oder Dispersion vorzugsweise in die Röhrchen oder die Vertiefungen eingefüllt und anschließend entweder ausgegossen oder darin belassen und im letzteren Fall das Lösungsmittel bzw. das Dispergiermedium abgedampft. Die Art der Trocknung richtet sich nach
35 den Verdampfungseigenschaften des jeweils verwendeten Lösungsmittels oder Dispergiermediums.

Vorzugsweise besteht der Überzug aus oder enthält Zellulosenitrat. Selbstverständlich kann auch der gesamte Formkörper aus Zellulosenitrat sein.

5 Ein soches Zellulosenitrat kann in Form einer Lösung beispielsweise durch Eintauchen oder durch Besprühen des Formkörpers aufgebracht werden. Es ist aber auch möglich das Zellulosenitrat in Form einer Dispersion aufzubringen.

10

Als Lösungsmittel ist im Falle von Zellulosenitrat beispielsweise Ethanol geeignet, doch sind auch andere Lösungsmittel verwendbar. Wesentlich ist, daß der Formkörper durch das Lösungsmittel nicht in einer Weise
15 verändert wird, daß seine Brauchbarkeit in Tests beeinträchtigt ist.

Es ist auch möglich, den Überzug in Form einer Folie oder beispielsweise durch Pulverbeschichtung aufzubringen.

20

Wird eine Lösung von Zellulosenitrat verwendet, beispielsweise in Ethanol, so liegt die Konzentration vorzugsweise zwischen 1 µg/ml und 20 mg/ml, vorzugsweise 2 µg/ml bis 2 mg/ml Zellulosenitrat.

25

Die biologischen Materialien mit bioaffinen Bindungseigenschaften können sein Proteine oder Glycoproteine, die die Funktion von Antigenen, von Antikörpern, hier sowohl polyklonale wie monoklonale, und von Lektinen haben. Weiterhin könne Lipoproteine, Glycolipide, Oligo- und Polysaccharide mit immunologischen oder mit nicht immunologischen Bindungseigenschaften an die Polymerschicht gebunden werden. Einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNS) oder einzelsträngige Ribonukleinsäure (RNS), sowie
30 deren Oligonukleotide werden ebenfalls an den Überzug gebunden, wodurch die derart beschichteten Flächen für Hybridisierungstechniken verwendbar werden.
35

- Für die zur Bindung an den Überzug vorgesehenen biologischen Materialien sind wässrige Lösungen sowie Pufferlösungen geeignet, in der diese gelöst oder dispergiert sind; dispergiert, wenn es sich um Glycolipide, Lipoproteine, Viren, Zellen sowie Bestandteile von Zellen eukaryoter oder procaryoter Struktur handelt. Die Lösungen können Zusätze enthalten, die die gleichmäßige Bindung der biologischen Materialien gewährleisten.
- 5
- 10 Die Konzentration des an den Überzug zu bindenden, jeweiligen biologischen Materials und die Lösung, beziehungsweise deren Pufferkomponenten, deren Ionenstärke und deren pH-Wert, und die Bedingungen, wie Temperatur und Zeitdauer des Zusammenbringens der Flüssigkeit, die das zu bindende
- 15 biologische Material enthält, und des mit dem Überzug versehenen Formkörpers werden im allgemeinen zum Erreichen einer gleichmäßigen und hohen Besetzung mit möglichst irreversibler Bindung des jeweiligen biologischen Materials an die Oberfläche in Vorversuchen ermittelt. Die Kon-
- 20 zentrationen der biologischen Materialien liegen beispielsweise zwischen 5 mg/ml und 5 ng/ml oder auch niedriger. Als Puffer werden beispielsweise Phosphat-, Tris/HCl- und Carbonat-Puffer in Konzentrationen von 10 bis 100 mM und der pH-Bereich von 7 bis 10, vorzugsweise
- 25 8,0 bis 9,6 verwandt. Die Zeit kann variiert werden zwischen 30 min und 20 h, die Temperatur zwischen 4°C und 80°C. Eine der möglichen Arbeitsweisen für solche Vorversuche ist für die Bindung von Proteinen an Polystyrol von Cantarero et al. (1980), Anal. Biochem.
- 30 105, 375-382, beschrieben.

Die mit Überzügen versehenen Formkörper können zur Herstellung eines analytischen Mittels verwendet werden.

- 35 Die Erfindung wird durch folgende Beispiele näher erläutert, ohne damit den Erfindungsgegenstand einzugrenzen.

Beispiel

1. Beschichtung von Mikrotestplatten mit Zellulosenitrat als Polymer

Mikrotestplatten aus Polystyrol (A/S Nunc, 4000 Roskilde, Dänemark, Kat.Nr. 262170, mit 96 Vertiefungen und rundem Boden, Qualität Standard hygienisch) wurden verwandt.

5 Es wurden Lösungen von Zellulosenitrat (NCA 400 und NCA 500 der Fa. Wolff Walsrode AG, 3030 Walsrode, Bundesrepublik Deutschland) in absolutem Ethanol in folgenden Konzentrationen hergestellt: 2 mg/ml und 50 µg/ml NCA 400, sowie 100 µg/ml NCA 500. Alle Vertiefungen von mehreren Mikrotestplatten wurden mit
10 jeweils 100 µl einer Lösung der genannten Konzentrationen und als Kontrolle nur mit dem Lösungsmittel Ethanol gefüllt. Das Lösungsmittel wurde anschließend durch Überblasen eines Luftstroms abgedampft.

15

2. Verwendung von mit einem Überzug aus Zellulosenitrat beschichteten Mikrotestplatten für einen Enzymimmunoassay (ELISA) zum Nachweis von Antikörpern gegen Mumps.

20

2.1. Bindung von Mumpsantigenen an die beschichteten und unbeschichteten Mikrotestplatten

25

Mumpsvirus, gezüchtet in Verozellen, und Verozellen, die nicht mit Mumpsvirus infiziert waren, wurden nach Nicolai-Scholten et al. (1980), Med.Microbiol. Immunol. 168, 81-90, zu Präparationen aufgearbeitet, die im weiteren als Mumpsantigen und als (negatives) Kontrollantigen bezeichnet werden.

5 In alle 192 Vertiefungen von jeweils 2 mit 100 µg/ml
Zellulosenitrat NCA 500 in Ethanol beschichteten und
von jeweils 2 nur mit Ethanol behandelten Mikrotest-
platten (siehe Beispiel 1) wurden gemäß Popow-Kraupp
et al. (1982), J.Med.Virol. 10, 119-129 und gemäß
Sakata et al. (1984), J.Clin.Microbiol. 19, 21-25,
jeweils 2 mal 48 50 µl Aliquote der Lösungen von
Mumpsantigen und von Kontrollantigen eingefüllt
derart, daß die mit den beiden Lösungen beschickten
10 Vertiefungen alternierend nebeneinanderlagen. Es
wurde 15 bis 20 h bei 4°C inkubiert. Anschließend
wurden die Lösungen abgesaugt und die Vertiefungen
gewaschen.

15 2.2. Nachweis von Mumpsantikörpern

Die Testdurchführung erfolgte im wesentlichen wie
von Nicolai-Scholten et al. beschrieben. Ein positi-
ves Kontrollserum wurde 1:1000 verdünnt mit einer
20 Lösung von 1 % Rinderserum, 4 % Polyoxiethylen-(20)-
sorbitanmonolaureat (Tween® 20) in 130 mM NaCl, 20
mM Natriumphosphat, pH 7,2 (PBS). Davon wurden
100 µl in alle 96 Vertiefungen pro Mikotestplatte
gegeben. Es wurde 1 h bei 37°C und bei gesättigter
25 Luftfeuchtigkeit inkubiert, anschließend dreimal mit
jeweils 300 µl einer Lösung von 1 % Tween® 20 in PBS
gewaschen. Es folgte eine Inkubation, d.h. 1 h bei
37°C, mit 50 µl pro Vertiefung der von
Nicolai-Scholten beschriebenen Lösung des Konjugates
30 von Anti-human IgG mit Alkalischer Phosphatase (AP).
Anschließend wurde wieder dreimal mit jeweils 300 µl
der Lösung von 1 % Tween® 20 in PBS gewaschen. Die
enzymatische Aktivität des in den Vertiefungen
gebundenen AP-Konjugates wurde bestimmt durch
35 Inkubation mit 100 µl pro Vertiefung einer Lösung
von 1,5 g/l p-Nitrophenylphosphat in 10 % Diethanol-
amin in Wasser, eingestellt mit HCl auf pH 9,8 bei

20 bis 25°C während 45 min. Die Reaktion wurde durch
Zugabe von 50 µl pro Vertiefung einer Lösung von 2 N
NaOH beendet. Die Extinktionen der gefärbten Lösun-
gen wurden bei 405 nm mit dem Gerät Titertek[®],
5 Multiskan MC, einem Photometer der Firma Flow
Laboratories Inc., McLean, Va. 22102, USA, gemessen.

2.3. Ergebnis

0 In Tabelle 1 ist das Ergebnis dargestellt. Die Ex-
tinktionen der mit Mumpsantigen beladenen Vertiefun-
gen bei den mit Zellulosenitrat behandelten Platten
sind etwa um das dreifache höher als bei den nur mit
dem Lösungsmittel Ethanol behandelten Platten. Die
5 mit dem (negativen) Kontrollantigen behandelten
Vertiefungen zeigen sowohl im Falle der Verwendung
von der mit Zellulosenitrat behandelten als auch von
nur mit dem Lösungsmittel behandelten Platten eine
niedrige Extinktion, die im ersten Fall zwischen
10 0,01 und 0,02 und im zweiten zwischen 0 und 0,01
liegt. Bei den mit Zellulosenitrat behandelten
Platten ist diese als Hintergrund zu bezeichnende
Extinktion als sehr niedrig zu bewerten, ein Zeichen
für geringe unspezifische Bindung des Kontrollserums
15 wie des AP-IgG-Konjugates. Hervorzuheben ist die
drei- mal höhere Extinktion bei den beschichteten
Platten, was eine Erhöhung der Empfindlichkeit um
die gleiche Größenordnung bedeutet.

Tabelle 1

Mikrotestplatte Überzug von Zellulosenitrat in µg pro Ver- tiefung	Mittlere Extinktions- und Standardabweichung bei 405 nm von Vertiefungen behandelt mit Mumpsantigen		Extinktionsdifferenz von Ver- tiefungen	
	Platte 1 n = 48	Platte 2 n = 48	Platte 1 n = 48	Platte 2 n = 48
10	0,410 ± 0,041	0,350 ± 0,030	0,390 ± 0,040	0,340 ± 0,031
0	0,150 ± 0,017	0,120 ± 0,015	0,140 ± 0,017	0,120 ± 0,015

0211229

3. Verwendung von mit Überzügen aus Zellulosenitrat beschichteten Mikrotestplatten für die DNS-Hybridisierung

5 3.1. Bindung von einzelsträngiger DNS an die beschichtete Mikrotestplatte

10 Es wurden Mikrotestplatten verwandt, deren Vertiefungen wie in Beispiel 1 beschrieben, mit Lösungen von jeweils 2 mg/ml und 50 µg/ml Zellulosenitrat NCA 400 und zur Kontrolle nur mit dem Lösungsmittel Ethanol behandelt worden waren.

15 In die Vertiefungen der beschichteten und in die der als Kontrollen nur mit Ethanol behandelten Vertiefungen wurden 100 µl von Verdünnungen von 500, 250, 50, 5 und 0 ng/ml DNS des Plasmids, pBW3 in Puffer von 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0, die durch 10 min Erhitzen auf 100°C, gefolgt von 5 min Kühlen auf
20 0°C, in Einzelstränge zerlegt worden war, eingefüllt. Die mit den Lösungen beladenen Platten wurden bei 80°C 8 h lang gehalten (gebacken), wobei sie zur Trockene eindampften.

25 3.2. Vorhybridisierung

Als Stammlösungen für die Herstellung von im folgenden aufgeführten Puffern wurden 50fach konzentrierte Denhardt'sche Lösung (Denhardt, 1966, Biochem.Biophys. Res.Comm. 23, 641-652): 10 g Ficoll[®] 400 (ein
30 Saccharose-Polymer der Fa. Pharmacia, Mg 400.000), 10 g Polyvinylpyrrolidon, MG 360.000, 10 g Rinderserumalbumin, gelöst in 1 l destilliertem Wasser und 20fach konzentrierte Citrat-gepufferte Kochsalzlösung
35 (SSC, Abkürzung für Standard sodium citrate), das heißt 3,0 M NaCl, 300 mM Trinatriumcitrat verwandt.

Für die Vorhybridisierung zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen wurden alle Vertiefungen mit jeweils 100 µl folgender Lösung gefüllt und 4 h bei 42°C inkubiert: 0,01 % Hefe RNS, 0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS), 1 % Glycin, 5-fach konzentrierte Denhardt'sche Lösung, 5-fach konzentrierte SSC, 50 % Formamid in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0.

3.3. Hybridisierung

Als Sonden-DNS wurde durch "Nick"-Translation biotinierte DNS des Plasmid pBW3 verwandt, hergestellt wie von Rigby et al. (1977), J.Mol.Biol. 113, 237-251, beschrieben, die auf die Konzentration von 250 ng/ml verdünnt worden war mit einer Lösung von 0,01 % Hefe-RNS, 0,1 % SDS, 10 % Dextransulfat, einfach konzentrierter Denhardt'scher Lösung, 5-fach konzentrierter SSC, 45 % Formamid in 20 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0. Die gebrauchsfertige Sondenlösung wurde erhalten, indem sie 10 min bei 100°C erhitzt und anschließend auf 0°C abgekühlt wurde.

In jede Vertiefung wurden 100 µl DNS-Sondenlösung eingefüllt. Zur Hybridisierung wurde 15 h bei 42°C inkubiert.

3.4. Detektion

Die Sondenlösung wurde abgesaugt. Es folgten mehrere Waschschrirte mit in der Reihenfolge angegebenen Mengen der folgenden Lösungen, den angegebenen Inkubationszeiten und Inkubationstemperaturen: 3mal jeweils 3 min bei 20 bis 25°C mit 300 µl 0,1 % SDS in 2-fach konzentrierter SSC, 3mal jeweils 3 min bei 20 bis 25°C mit 300 µl 0,1 % SDS in 0,2-fach konzentrierter SSC,

2mal jeweils 15 min bei 50°C mit 300 µl 0,1 % SDS in
0,16-facher SSC und
3mal jeweils 1 min bei 20-bis 25°C mit 150 µl 0,1 %
SDS in 2-facher SSC.

5

Anschließend wurde jeweils einmal mit jeweils 300 µl
pro Vertiefung der im folgenden als Puffer A und als
Puffer B bezeichneten Lösungen behandelt, um un-
spezifische Bindung von Protein an die Festphase zu
vermeiden.

10

Puffer A: 0,05 % 4-Octylphenoxipolyethoxiethanol (Triton®
X 100), 0,1 M Tris/HCl, 0,1 M NaCl, 2 mM MgCl₂,
pH 7,5, 1 min bei 20 bis 25°C;

15 Puffer B: 3 % Rinderserumalbumin in Puffer A, 20 min bei
42°C.

Es folgte eine Inkubation, das heißt eine Wärmebehandlung
bei 80°C für 10 min ohne Puffer.

20

Zur Detektion wurden die Vertiefungen erst wieder mit 300
µl Puffer B gefüllt, die Flüssigkeit 20 min bei 20 bis
25°C darin belassen und danach wieder abgesaugt.

25 100 µl pro Vertiefung einer Lösung von 2 µg/ml Streptavidin
(Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Ma. 20877,
USA) in Puffer A wurden 1 h bei 20 bis 25°C inkubiert.

Danach wurde dreimal zu jeweils 2 min mit 300 µl Puffer A
gewaschen. Es folgte die Inkubation von 100 µl pro Ver-

30 tiefung DNA Detection System in einer Konzentration von 1
µg/ml in Puffer A 1 h bei 20 bis 25°C. DNA-Detection
System (Bethesda Res.Labs.) ist ein Polymer enthaltend

biotinierte alkalische Phosphatase, hergestellt wie von
Leary et al. (1983), Proc.Nat.Acad.Sci. 80, 4045-4049,

35 beschrieben. Anschließend wurde zur Entfernung von nicht
gebundenem DNA-Detection System jeweils dreimal 2 min bei
20-25°C mit 300 µl folgender zwei Pufferlösungen gewaschen:

Puffer A

und 0,1 M Tris/HCl, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9,5.

5 Mit 100 µl pro Vertiefung einer Lösung von 1,5 mg/ml
p-Nitrophenylphosphat in 10 % Diethanolamin in
Wasser, eingestellt mit HCl auf pH 9,8, als Substrat
für die alkalische Phosphatase wurde bei 37°C 45 min
lang inkubiert und danach die enzymatische Hydrolyse
10 durch Zugabe von 50 µl pro Vertiefung 2 N Natronlauge
beendet. Die Extinktionen der gefärbten Lösungen
wurden bei 405 nm in den Vertiefungen ebenfalls mit
dem Gerät Titertek® Multiskan MC gemessen.

3.5. Ergebnis und Bewertung des Ergebnisses

15 In Tabelle 2 ist das Ergebnis dargestellt. Vertiefungen, die wie bei 3.1. beschrieben mit 2mg/ml und mit 50 µg/ml Zellulosenitrat NCA 400 beschichtet und anschließend mit einzelsträngiger DNS des Plasmids
20 pBW3 der Konzentrationen 5 bis 500 ng/ml durch Backen behandelt worden waren, erzeugen nach der Hybridisierung und Bindung des DNS-Detektionssystem an die Sonde Farbsignale, die mit steigender DNS-Konzentration zunehmen. Das Farbsignal des Hinter-
25 grounds, das heißt das in den Vertiefungen, die nicht mit DNS behandelt worden waren, ist niedriger und auch etwa so schwach, wie das in den Vertiefungen, die nicht mit Zellulosenitrat beschichtet, aber mit DNS der genannten Konzentrationen behandelt worden
30 waren (Kontrollen). Das Ergebnis zeigt, daß ohne Beschichtung mit dem Überzug keine DNS nachweisbar ist.

Tabelle 2

Mikrotestplatte: Extinktionen bei 405 nm nach DNS-Hybridisierung und Detektion
 Überzug von mit AP Detektionssystem für DNS bei vorangegangener Behandlung
 Zellulosenitrat (Backen) mit einzelsträngiger DNS des Plasmids pBW3 mit den
 in µg/Vertiefung Mengen

	50	25	5	0,5	0
	ng pro Vertiefung				
200	2,31	1,61	0,62	0,25	0,10
5	1,92	1,40	0,69	0,25	0,10
0	0,15	0,15	0,19	0,15	0,15

Patentansprüche:

1. Formkörper mit einem Überzug aus einem Polymer, wobei die Kombination für wässrige Lösungen undurchlässig ist, dadurch gekennzeichnet, daß der Überzug aus einem Polymer besteht oder ein solches enthält, das die Eigenschaft besitzt, aus wässrigen Lösungen biologische Substanz, die ein bioaffiner Bindungspartner ist, zu binden.
2. Formkörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Überzug ein synthetisches, natürliches oder durch eine chemische Reaktion modifiziertes oder derivatisiertes natürliches Polymer enthält.
3. Formkörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Überzug Zellulosenitrat enthält.
4. Verwendung eines Formkörpers nach Anspruch 1 als Bestandteil eines diagnostischen Testbesteckes.
5. Verfahren zur Herstellung eines für wässrige Lösungen undurchlässigen analytischen Mittels bestehend aus einem Verbund von einem Formkörper und einem Überzug sowie aus an der Oberfläche des Überzugs gebundene Komponenten von bioaffinen Bindungspartnern, dadurch gekennzeichnet, daß der Formkörper zuerst mit dem Überzug versehen wird, derart, daß ein für wässrige Lösungen undurchlässiger Verbund entsteht, und daß dieser Verbund mit einer wässrigen Lösung oder wässrigen Dispersion einer oder mehrerer Komponenten von bioaffinen Bindungspartnern behandelt wird, so daß diese Komponente oder

0211229

Komponenten an die Oberfläche des Überzugs gebunden werden.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente vom bioaffinen Bindungspartnern ein Virus oder ein Bestandteil eines Virus sowie Bestandteile von Zellen mit eucaryoter oder pro-caryoter Struktur, eine einzelsträngige DNS oder RNS oder deren Oligonukleotide, ein Protein oder Peptid, ein Glycoprotein, Glycolipid, Glycan oder Lipoprotein ist oder sind.
7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Formkörper eine Mikrottestplatte ist.
8. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß für die Herstellung des Überzugs eine Lösung, eine Dispersion oder ein Pulver enthaltend ein synthetisches Polymer, natürliches Polymer oder ein durch eine chemische Reaktion modifiziertes oder derivatisiertes natürliches Polymer verwandt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß zur Herstellung des Überzugs eine Lösung oder eine Dispersion von Zellulosenitrat aufgebracht wird und das Lösungsmittel oder das Dispergiermedium durch Trocknung entfernt wird.
10. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindung von Komponenten von bioaffinen Bindungspartnern aus wässrigen Lösungen oder Dispersionen enthaltend ein Virus oder einen Bestandteil

eines Virus sowie Bestandteilen von Zellen mit eucaryoter oder procaryoter Struktur, eine einzelsträngige DNS, RNS oder eines Oligonukleotids von diesen, ein Protein oder Peptid oder ein Glycoprotein, Glycolipid, Glycan oder Lipoprotein an die mit den Überzügen versehenen Formkörpern durch Inkubieren der Lösungen oder der Dispersionen mit diesen vorgenommen wird.

(12) EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 86108907.6

(51) Int. Cl.³: G 01 N 33/53
//G01N33/543, C12Q1/68

(22) Anmeldetag: 01.07.86

(30) Priorität: 09.07.85 DE 3524451

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
25.02.87 Patentblatt 87/9

(88) Veröffentlichungstag des später
veröffentlichten Recherchenberichts: 16.12.87

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

(71) Anmelder: BEHRINGWERKE Aktiengesellschaft
Postfach 1140
D-3550 Marburg 1(DE)

(72) Erfinder: Franze, Reinhard, Dr.
Michaelsgasse 2
D-3551 Lahntal-Sterzhausen(DE)

(72) Erfinder: Beschle, Hans Georg, Dr.
Albert-Demnitz-Weg 6
D-3550 Marburg(DE)

(74) Vertreter: Becker, Heinrich Karl Engelbert, Dr. et al,
HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT Central Patent
Department P.O. Box 80 03 20
D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

(54) Mit Überzügen versehene Formkörper zur Bindung von bioaffinen Substanzen, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie ihre Verwendung.

(57) Es werden Formkörper mit Überzügen aus Polymeren beschrieben, die an ihrer Oberfläche biologische Substanzen mit bioaffinen Bindungseigenschaften binden sowie Formkörper, an die solche biologischen Substanzen gebunden sind. Weiterhin werden Verfahren zur Herstellung solcher Formkörper beschrieben.

Formkörper versehen mit Überzügen und daran gebundenen biologischen Materialien können beispielsweise als diagnostisches Mittel in Enzymimmunoassays oder Assays, die von einer Nukleinsäurehybridisierung Gebrauch machen, verwendet werden.

EP 0 211 229 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

0211229

Nummer der Anmeldung

EP 86 10 8907

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)
X	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 98, Nr. 11, 14. März 1983, Seite 243, Nr. 85532w, Columbus, Ohio, US; I.C. SHEKARCHI et al.: "Microsticks as solid-phase carriers for enzyme-linked immunosorbent assays", & J. CLIN. MICROBIOL. 1982, 16(6), 1012-1018 * insgesamt *	1-10	G 01 N 33/53 G 01 N 33/543 C 12 Q 1/68
X	FR-A-2 430 013 (SOCIETY ANONYME SEBIA) * Beispiel 1; Ansprüche 1, 4, 5, 8, 9, 11 *	1-3, 5, 6, 8, 10	
A		4, 7, 9	
X	DE-A-3 321 629 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO. LTD.) * Seite 10, Zeile 1 - Seite 11, Zeile 21; Ansprüche 1-13 *	1, 2, 4, 8, 10	G 01 N 33/53 C 12 Q 1/68
X	DE-A-2 847 995 (INTERNATIONAL DIAGNOSTIC TECHNOLOGY, INC.) * Seite 7, letzter Absatz - Seite 8, letzte Zeile; Ansprüche 1, 2, 4 *	1-7, 10	
X	DE-A-3 346 795 (E. GEYER) * Beispiel 1, Ansprüche 1, 5 *	1-7, 10	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort BERLIN		Abschlußdatum der Recherche 28-08-1987	Prüfer WALLINDER
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			

EP Form 1503 03 82

0211229



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 86 10 8907

Seite 2

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4)
X	CLINICAL CHEMISTRY, Band 29, Nr. 5, Mai 1983, Seiten 823-827, Washington, US; M. ISHAQ et al.: "Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to extractable nuclear antigens in systemic lupus erythematosus, with nylon as solid phase" * Seite 823, Zusammenfassung; Seiten 823,824, Materials and Methods *	1,2,4- 7,10	
P,X	DD-A- 236 400 (ERNST-MORITZ-ARNDT UNIVERSITÄT) * insgesamt *	1-10	
P,X	EP-A-O 163 799 (D. KÖHLER) * Seite 4, Zeile 34 - Seite 5, Zeile 21; Ansprüche 1,7 *	1-7,10	
P,X	EP-A-O 174 247 (B. GUERIN et al.) * Ansprüche 1,4,9,15,16 *	1-7,10	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort BERLIN		Abschlußdatum der Recherche 28-08-1987	Prüfer WALLINDER
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung sein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung der selben Kategorie A : technischer Hintergrund D : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze		E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist L : der Anmeldung angeführtes Dokument S : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPA form 1503 03 02

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ ~~FADED~~ TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.